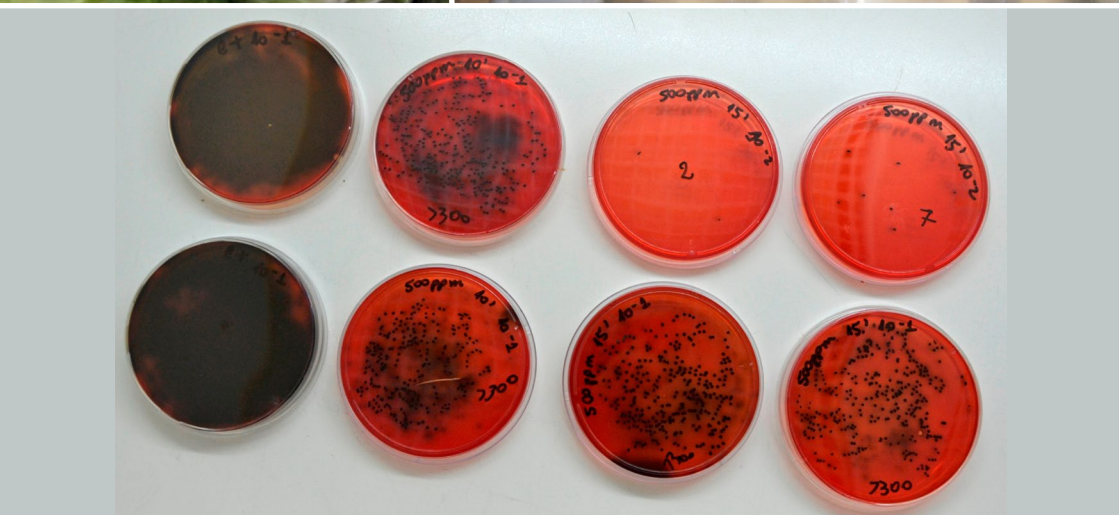


Controle de *Listeria Monocytogenes* em Repolho com Óleo Essencial de Capim-limão



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 89

Controle de *Listeria Monocytogenes* em Repolho com Óleo Essencial de Capim-limão

*Terezinha Feitosa Machado
Rita de Cássia Alves Pereira
Janaína de Oliveira Rebouças
Claudilane Martins Pontes
Tamyres Fernandes Xavier*

Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2014

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici

CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Fone: (85) 3391-7100

Fax: (85) 3391-7109

www.cnpat.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Marlon Vagner Valentim Martins*

Secretário-Executivo: *Marcos Antônio Nakayama*

Membros: *José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues*

Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa

Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda

Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*

Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid*

Fotos da capa: *Terezinha Feitosa Machado*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

1ª edição (2014): versão eletrônica

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Controle de *Listeria monocytogenes* em repolho com óleo essencial de capim-limão / Terezinha Feitosa Machado. [et al.]. - Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2014.

13 p. ; 14,8 cm x 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1677-1907 ; 89).

1. *Cymbopogon citratus*. 2. Óleo essencial. 3. *Brassica capitata* (L.). I. Machado, Terezinha Feitosa. II. Pereira, Rita de Cássia Alves. III. Rebouças, Janaína de Oliveira. IV. Pontes, Claudilane Martins. V. Xavier, Tamyres Fernandes. VI. Série.

CDD 661.806

© Embrapa 2014

Sumário

Resumo	4
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	8
Resultados e Discussão.....	9
Conclusão	11
Referências	12

Controle de *Listeria* *Monocytogenes* em Repolho com Óleo Essencial de Capim-limão

***Terezinha Feitosa Machado*¹**
***Rita de Cássia Alves Pereira*²**
***Janaína de Oliveira Rebouças*³**
***Claudilane Martins Pontes*⁴**
***Tamyres Fernandes Xavier*⁵**

Resumo

O mercado de produtos hortifrutícolas frescos tem crescido de maneira significativa nesta última década. Tradicionalmente, esses produtos não eram alvo de muita preocupação por parte de órgãos regulamentadores, pois eram considerados seguros já que eram lavados e rapidamente consumidos no próprio local de preparo. Com a tendência ao consumo das hortaliças minimamente processadas, a preocupação com riscos de natureza microbiológica torna-se acentuada. Neste estudo, o óleo essencial (OE) de capim-limão foi utilizado nas concentrações de 500, 750 e 1.000 ppm por 5, 10 e 15 minutos como tratamento de desinfecção de folhas de repolho inoculadas com *Listeria monocytogenes*. Para a quantificação de *L. monocytogenes*, as amostras inoculadas foram diluídas em série, e a população viável foi determinada por plaqueamento em ágar Palcam. Os resultados

¹ Engenheira de alimentos, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, terezinha.feitosa@embrapa.br

² Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Fitotecnia/Plantas Medicinais, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, rita.pereira@embrapa.br

³ Graduanda em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, nainareboucas@hotmail.com

⁴ Graduanda em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, claudilane17@yahoo.com.br

⁵ Graduanda em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, tamyres_27@msn.com

mostraram que a redução bacteriana das amostras tratadas com o OE foi de 50% para os tratamentos com 500 ppm, 66,6% para os tratamentos com 750 ppm e 83,3% para os tratamentos com 1.000 ppm, sinalizando que o óleo essencial do capim-limão tem potencial para ser utilizado em tratamentos de lavagem para o controle de *L. monocytogenes* em produtos hortícolas frescos.

Termos para indexação: *Cymbopogon citratus*; óleo essencial; *Brassica capitata* (L.).

Control of *Listeria Monocytogenes* in Cabbage with Essential oil of Lemon Grass

Abstract

*The fresh produce market has grown significantly in the last decade. Traditionally, these products were not the subject of much concern among regulators agencies, because they were considered safe since they were washed and quickly consumed on site preparation. With the trend toward the consumption of minimally processed vegetables, the concern about risks of microbiological nature becomes accentuated. In this study, the lemon grass essential oil (EO) was used at concentrations of 500, 750 and 1,000 ppm for 5, 10 and 15 minutes as a treatment of disinfection of cabbage leaves inoculated with *Listeria monocytogenes*. For the quantification of *L. monocytogenes* inoculated samples were serially diluted and viable population was determined by plating on agar Palcam. The results showed that the bacterial reduction of samples treated with the EO was 50% for treatments with 500 ppm, 66.6% for treatments with 750 ppm and 83.3% for treatments with 1,000 ppm, signaling that the lemon grass essential oil has the potential to be used in washing treatments for the control of *L. monocytogenes* in vegetables.*

Index terms: Cymbopogon citratus; essential oil; Brassica capitata (L.).

Introdução

O setor de hortaliças frescas minimamente processadas constitui um segmento da agroindústria em rápido crescimento, respondendo à demanda atual por produtos vegetais in natura, preparados convenientemente para utilização em ambientes domésticos e institucionais (ALEGRE et al., 2013).

Tradicionalmente, os produtos frescos não eram alvo de muita preocupação por parte de órgãos regulamentadores, pois eram considerados seguros, já que eram lavados e rapidamente consumidos no próprio local de preparo. Atualmente, com a tendência ao consumo de hortaliças minimamente processadas, a preocupação com riscos de natureza microbiológica torna-se acentuada, pois operações como corte, lavagem e embalagem são fontes de contaminação, cuja quantidade e variedade de microrganismos variam de acordo com o alimento (LITTLE et al., 2003).

Com o aumento do consumo de frutas e hortaliças minimamente processadas, surtos de doenças associadas ao consumo desses produtos vêm sendo relatados (RHEE et al., 2003; STRACHAN et al., 2005). Os surtos de *L. monocytogenes* chamam a atenção para a gravidade da listeriose em seres humanos e para o risco de contaminação, por essa bactéria, em todos os alimentos. O risco é mais elevado em alimentos refrigerados e prontos para o consumo, pois *L. monocytogenes* é um dos poucos agentes patogênicos alimentares capazes de se multiplicarem em temperaturas refrigeradas. Sua presença tem sido relatada em rabanete, repolho, pepino, cogumelos e alface (CARLIN; NGUYEN-THE, 1994; FARBER et al., 1998)

O cloro, em suas várias formas, especialmente nas de sais de hipoclorito, é um dos sanitizantes mais empregados na indústria de alimentos. Todavia, sua eficácia é dependente do seu estado físico e químico, das condições de tratamento, da resistência dos microrganismos e da natureza de superfície do produto. Além disso, em soluções aquosas, o cloro pode também formar compostos clorados

nocivos, tais como cloraminas e trihalometanos (LEE et al., 2006). Devido a essas limitações, existe uma necessidade de alternativas de sanitizantes para reduzir ou eliminar a contaminação microbiana desses produtos.

Os óleos essenciais (OE) de plantas têm sido utilizados com diferentes fins em medicamentos e cosméticos por sua propriedade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (BAJPAI et al., 2008). Além disso, por sua propriedade antimicrobiana, têm sido avaliados como conservantes em vários alimentos (KARAGÖZLÜ et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito antimicrobiano do OE do capim-limão (*Cymbopogon citratus*) sobre a redução de sobrevivência de *Listeria monocytogenes* inoculada em folhas de repolho (*Brassica capitata* L.) minimamente processadas.

Material e Métodos

Material vegetal

Amostras de folhas de capim-limão foram obtidas de plantas provenientes do Campo Experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, localizado no Município de Paraipaba, CE. Uma subamostra da espécie foi depositada no Herbário da Embrapa Recursos Genéticos, com o número de Tombo 73.792.

Extração do óleo essencial

O material vegetal foi submetido à hidrodestilação por 4 horas, utilizando um aparelho do tipo Clevenger. O OE separado por centrifugação foi submetido à secagem com Na_2SO_4 , transferido para frascos de vidro âmbar com tampa rosqueada, os quais foram armazenados sob refrigeração até o momento das análises (CRAVEIRO et al., 1976).

Cultura bacteriana

A cepa bacteriana usada neste estudo foi *Listeria monocytogenes* ATCC 19117. A cultura foi mantida a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, Becton Dickinson, USA) contendo 10% de

glicerol. A cultura de trabalho foi preparada pelo subcultivo de 100 μ L da cultura estoque em 9 mL de BHI e incubada a 35 °C/24h. Após esse período a cultura foi diluída em solução de NaCl 85% até alcançar turbidez similar ao tubo 0,5 da escala McFarland (Biomérieux Inc. Darmstadt, Germany), correspondendo a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Inoculação e tratamentos do repolho

As folhas externas das amostras de repolho, adquiridas do mercado de varejo, foram removidas e descartadas. As demais foram lavadas individualmente em água corrente e expostas à luz UV por 20 minutos. Na sequência, foram cortadas em pequenos pedaços (20 mm x 20 mm) com faca esterilizada e inoculadas com cultura pura de *L. monocytogenes* (8 log UFC/g) na superfície adaxial. Diferentes porções de 25 g de folhas inoculadas foram acondicionadas em placas de Petri estéreis e armazenadas a 4 °C/24 horas. Após incubação, as folhas inoculadas com o patógeno foram transferidas para um béquer contendo 100 mL da solução do OE em diferentes concentrações (500, 750 e 1.000 ppm) e agitadas manualmente por 5, 10 e 15 minutos.

Enumeração de *Listeria monocytogenes*

Para a quantificação de *L. monocytogenes*, as amostras de repolho inoculadas foram diluídas em série, e a população viável foi determinada por plaqueamento em ágar Palcam (Becton Dickinson, USA) após incubação a 35 °C/24h. Os resultados foram expressos em log UFC/g do produto.

Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento estatístico inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3x3) em duplicata. O número de colônias bacterianas foi utilizado para a análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pela diferença mínima significativa (DMS), usando o teste Tukey ao nível de 5%.

Resultados e Discussão

O crescimento de *L. monocytogenes* em repolho em função da presença do OE de capim-limão pode ser visualizado na Tabela 1.

A contagem média de *L. monocytogenes* na amostra controle foi de 4,6 log UFC/g. Os tratamentos com 500, 750 e 1.000 ppm de OE reduziram essa contagem em média para 3,62 log UFC/g, 2,43 log UFC/g e 1,74 log UFC/g, respectivamente. Observou-se que, utilizando o OE de capim-limão em diferentes concentrações, houve diminuição da contagem de *L. monocytogenes* nas amostras de repolho, e o tratamento com 1.000 ppm apresentou maior redução na contagem microbiana. Considerando que os tempos de contato do óleo com a amostra (5, 10 e 15 minutos) não apresentaram diferença significativa no efeito bactericida ($p < 0,05$) (Tabela 1), acredita-se que o efeito antimicrobiano do OE do capim-limão seja devido à presença de α - e β -citral em sua composição.

Tabela 1. Efeito do óleo essencial de capim-limão na sobrevivência de *Listeria monocytogenes* inoculada em amostras de repolho (log UFC/g).

Tempo (min)	Concentração do óleo (ppm)		
	500	750	1.000
5	3,69aA	2,66aA	NR
10	3,70aA	2,36aA	1,98aA
15	3,48aA	2,26aA	1,88aA
Média	3,62	2,43	1,74

Controle +: 4,6 ciclos de log UFC/g. NR: não realizado. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais entre colunas indicam não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Tratamentos de desinfecção de produtos frescos, comumente feitos com hipoclorito de sódio e ácidos orgânicos fracos, vêm sendo estudados com extratos e OE de plantas. Os resultados são favoráveis e ambos, extratos e OE, surgem como possíveis alternativas a esses compostos. Belletti et al. (2008) avaliaram o efeito do OE de limão (*Citrus medica*) no crescimento e sobrevivência de *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis e *L. monocytogenes* inoculadas em salada de frutas. Relataram que nenhuma das três espécies microbianas foi

apta a crescer, mas a sobrevivência de todos foi afetada de forma diferente e significativa, sendo *L. monocytogenes* a mais sensível à presença do OE. Resultados similares foram relatados por Kim et al. (2011) utilizando extrato de cravo para a desinfecção de amostras de alface inoculadas com *L. monocytogenes*. Relataram redução significativa na sobrevivência do patógeno. Ainda que o OE usado seja diferente, os resultados são similares aos relatados por Moore-Neibel et al. (2011), que, utilizando OE de capim-limão, observaram o efeito antimicrobiano na redução de sobrevivência de *Salmonella* Newport inoculada em alface. Os resultados no presente estudo corroboram os demais citados, revelando a eficácia do OE de capim-limão contra *L. monocytogenes* na superfície de repolho estocado sob refrigeração.

Conclusão

O óleo essencial de capim-limão tem efeito antimicrobiano contra *L. monocytogenes* inoculado em folhas de repolho armazenadas em condições de refrigeração. Esse resultado leva a inferir que o óleo de capim-limão tem potencial para controle de patógenos em vegetais. Novos trabalhos devem ser realizados para determinar concentrações e períodos capazes de inibir por completo o patógeno.

Referências

ALEGRE , I.; VIÑAS , I.; USALL , J.; TEIXIDÓ , N.; FIGGE , M. J.; ABADIAS, M. Control of foodborne pathogens on fresh-cut fruit by a novel strain of *Pseudomonas graminis*. **Food Microbiology**, v. 34, p. 390-399, 2013.

BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p.117-122, 2008.

BELLETTI, N.; LANCIOTTI, R.; ATRIGNANI, F. P.; ARDINI, F. G. Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in Fruit-Based Salads. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 7, p. 331-338, 2008.

CARLIN, F.; NGUYEN-THE, C. Fate of *Listeria monocytogenes* on four types of minimally processed green salads. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, p. 222-226, 1994.

CRAVEIRO A. A.; MATOS, F. J.; ALENCAR, J. W. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. **Journal of Chemical Education**, v. 53, n. 10; p. 652, 1976.

FARBER, J. M.; WANG, S. L.; CAI, Y., ZHANG, S. Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh-cut vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 61, p.192-195, 1998.

KARAGÖZLÜ, N.; ERGÖNÜL, B.; ÖZCAN, D. Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* in fresh-cut lettuce and purslane. **Food Control**, v. 22, p.1851-1855, 2011.

KIM, S. Y.; KANG, D. H; KIM, J. K; HA, Y. G.; HWANG, J. Y.; KIM, T.; LEE, S. H. *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 41-46, 2011.

LEE, S. Y.; DANCER, G. I.; CHANG, S. S.; RHEE, M. S.; KANG, D. H. Efficacy of chlorine dioxide gas Against *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores on apple surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 364-368, 2006.

LITTLE, C. L.; OMOTOYE, R.; MITCHELL, R. T. The microbiological quality of ready-to-eat foods with added spices. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 13, p. 31- 42, 2003.

MOORE-NEIBEL, K.; GERBER, C.; PATEL, J.; FRIEDMAN, M.; RAVISHANKAR, S. Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella* enterica on organic leafy greens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 485-492, 2011.

RHEE, M. S.; LEE, S. Y.; DOUGHERTY, R.H.; KANG, D.;H. Antimicrobial effects of mustard flour and acetic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2959-2963, 2003.

STRACHAN, N. J. C.; DOYLE, M. P.; KASUGA, F.; ROTARIU, O.; OGDEN, I. D. Dose response modeling of *Escherichia coli* O157:H7 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 35-47, 2005.



Agroindústria Tropical

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

